

热激蛋白在B型烟粉虱适应温度变化中的作用

任课教师：罗静初 教授

小组成员：王娟 刘桂清 陈景超

报告人：王玲

报告时间：2013年1月11日



中国农业科学院2012级生物信息学博士班



提 纲

1

热激蛋白简介

2

Hsp70简介

3

昆虫Hsp70的功能

4

B型烟粉虱*Hsp70*的序列分析

5

B型烟粉虱*Hsp70*的诱导表达

6

RNA干扰

7

结 论



热激蛋白简介

——热激蛋白的定义

热休克蛋白(Heat Shock Protein,HSPs), 又称热激蛋白, 是生物受到环境中物理、化学、生物等**应激原刺激**时发生应激反应而合成的蛋白质, 普遍存在于各类生物细胞中。

HSPs是一类高度保守的糖蛋白, 不同的生物无论其进化程度如何, 其分子结构都有很高的同源性, 但不同族的HSPs之间无明显序列同源性。



热激蛋白简介

——热激蛋白的发现

- ❖ HSP首先是在**果蝇**体内发现的。
- ❖ 1962年Ritossa发现，将果蝇的培养湿度从25℃提高到30℃（热休克环境温度升高），30分钟后就可在多丝染色体上看到蓬松现象（或称膨突 puff），**提示**这些区带基因的转录加强并可能有某些蛋白质的合成增加。
- ❖ 1974年Tissieres研究证实该现象的产生是因为温度高增强了这一区域的基因转录，相应生成了一系列分子量为70kDa和26kDa的蛋白质这些蛋白质被命名为热休克蛋白质（HSP）。



热激蛋白简介

——热激蛋白的分类

**最保守、最重要
主要热休克蛋白**

HSP家族	主要成员 (真核蛋白)	功能
HSP104	Hsp104	耐极限温度
HSP90 (83~90 KD)	Hsp90, Grp94	促进甾醇激素受体与激素的结合及与DNA结合, 调节激酶磷酸化活性
HSP70 (66~78 KDa)	DnaK	Hsp71, Hsp70, Hsp72, Grp78 (BiP), Hsx70 (仅灵长类)
HSP60	GroEL	Hsp60
HSP40	DnaJ	Hsp40
HSP33		Hsp33 33 kDa chaperonin
smHSP (10~30 KDa)	GrpE, GroES,	Hsp27, HSPB6, HspB1, Hsp10

主要参与线粒体、叶绿体蛋白质翻译后的折叠

作为Hsp70的辅助因子

参与调节氧化还原反应, 是细菌面临氧化压力的重要防御体系

参与蛋白质折叠、去折叠及多聚复合物的组装

Hsp70简介

Hsp70

结构型Hsc70
(Heat Shock Cognate 70)

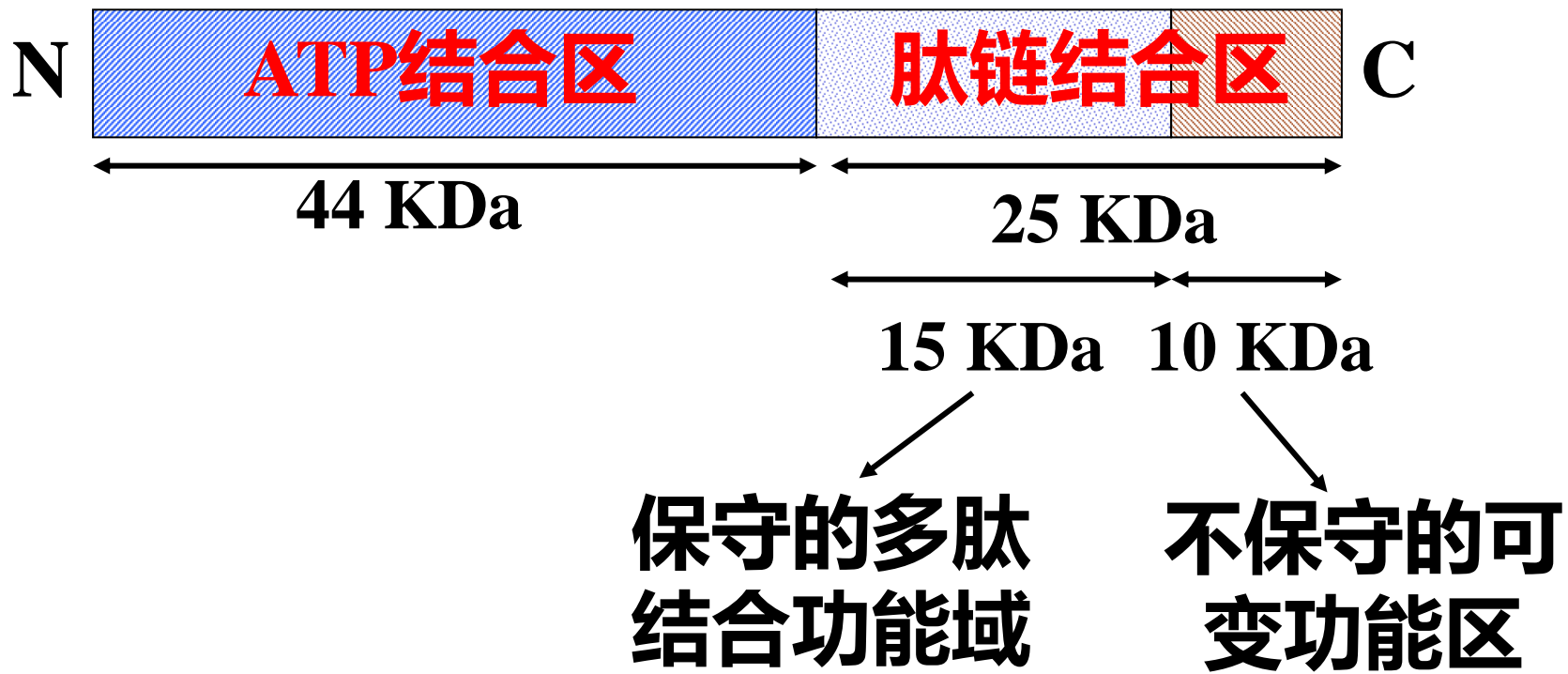
氨基酸序列90%相同
蛋白结构与功能相近

诱导型Hsp70
(Heat Shock Protein 70)

↓ ↓
高度保守性 能与ATP结合

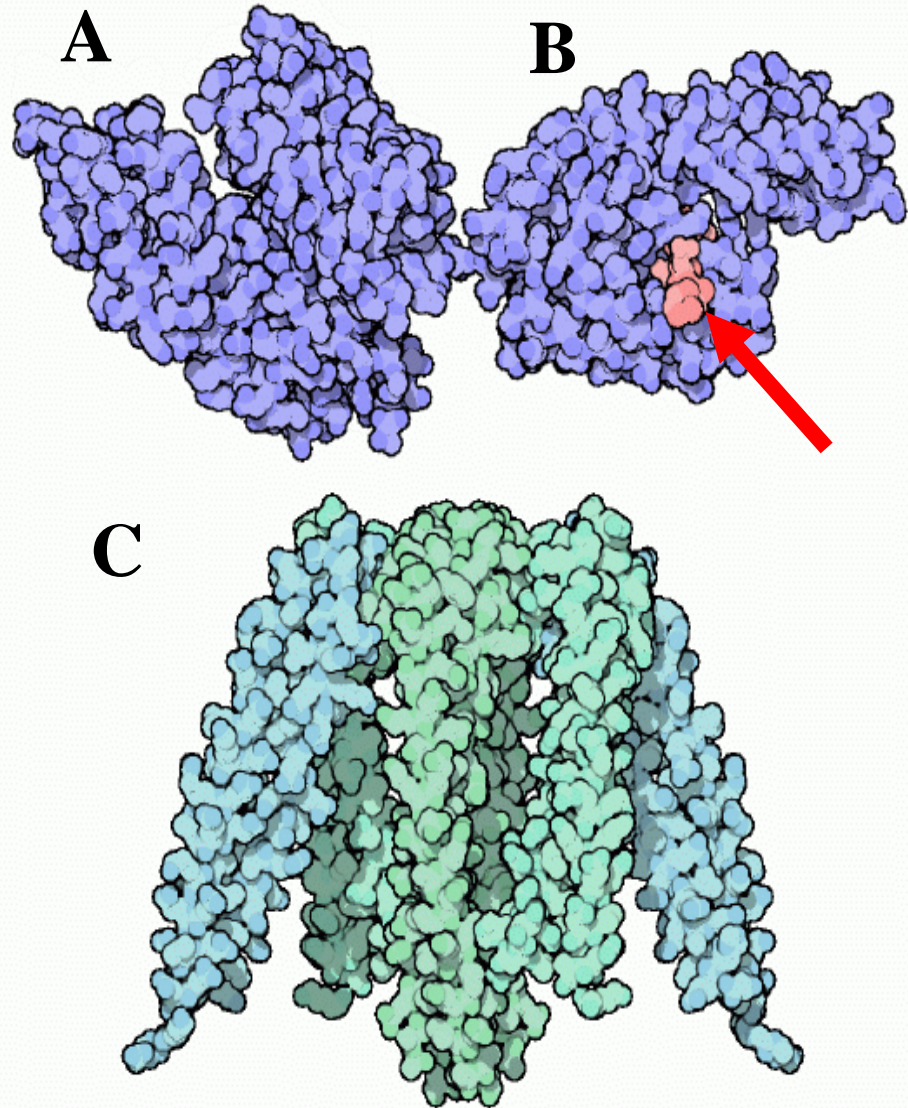


HSP70结构

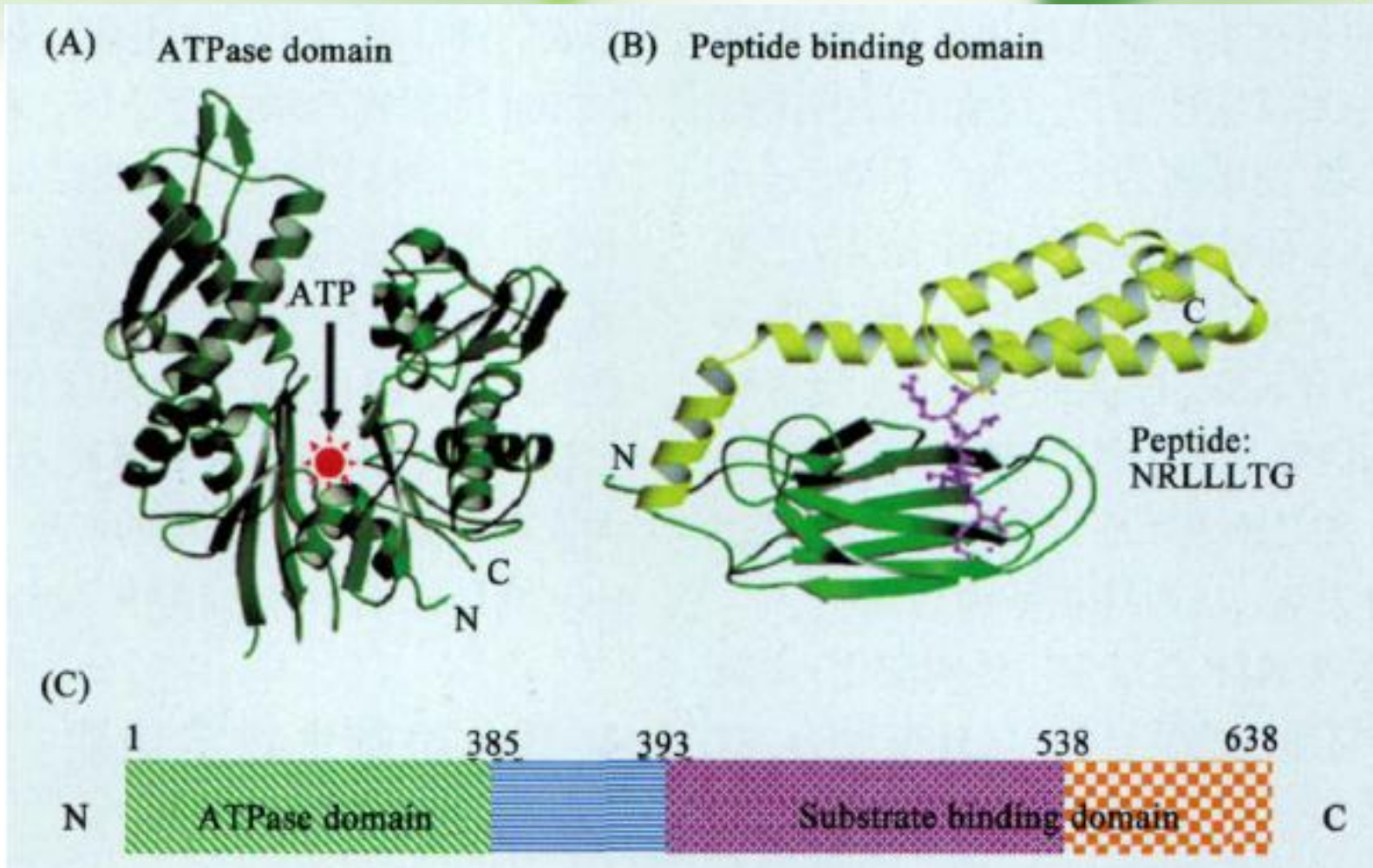


HSP70结构

- ❖ HSP70由两个结构域组成：一个结构域（蛋白质编号`1dkg`）是**ATP的结合位点**，并且控制ATP的结合过程（分子结构如图A所示）
- ❖ 另一个结构域（蛋白质编号`1dkz`）是**富含碳的肽链的结合位点**（分子结构如图B所示），图中以粉色表示的小肽段是蛋白质结合的缝隙
- ❖ 图C中**水母状结构**的前折叠素 Prefoldin（蛋白质编号`1fxk`）也执行类似的功能，即**包裹折叠过程中的蛋白质链**，功能上可替代Hsp70。



HSP70结构



Structures of the ATPase domain (A) and the peptide-binding domain (B), distribution map of the structure of Hsp70 (C)

昆虫Hsp70的功能

昆虫Hsp70

延长果蝇寿命

影响昆虫的发育与分化

分子伴侣

与昆虫耐热性相关

细胞保护

与昆虫滞育密切相关

免疫作用：激活抗原递呈细胞

诱导热激蛋白产生的温度阈值与昆虫的耐热性正相关

提高昆虫机体的耐热性

表达量与昆虫耐热能力正相关

使昆虫快速获得耐热性

热激蛋白氨基酸序列和基因结构变异与昆虫耐热性之间的关系



烟粉虱简介

烟粉虱 *Bemisia tabaci* 属同翅目、粉虱科、小粉虱属，是一种世界性重要农业害虫，寄主范围十分广泛，通过取食韧皮部汁液、传播病毒等多种方式为害超过600种植物。

烟粉虱又是一个由多种生物型组成的复合种，包括至少24个生物型，它们在形态上难以区分，而在传毒能力、发育速度、寄主范围、蛋白质和核酸的多态性等方面有差异。



烟粉虱简介

B型烟粉虱分布广、竞争能力强，在一些地方逐渐取代其他生物型烟粉虱，成为**优势生物型**。

区别B型与其它生物型的特征之一是它们**引起的植物生理异常**，包括西葫芦银叶反应和番茄的不规则成熟，这也常是B型侵入一个新区的判定指标。



研究表明：B型烟粉虱能够爆发与其自身对温度的适应性有关，B型烟粉虱的耐热和耐寒能力均高于温室白粉虱，因此B型烟粉虱对温度的适应性要强于温室白粉虱。

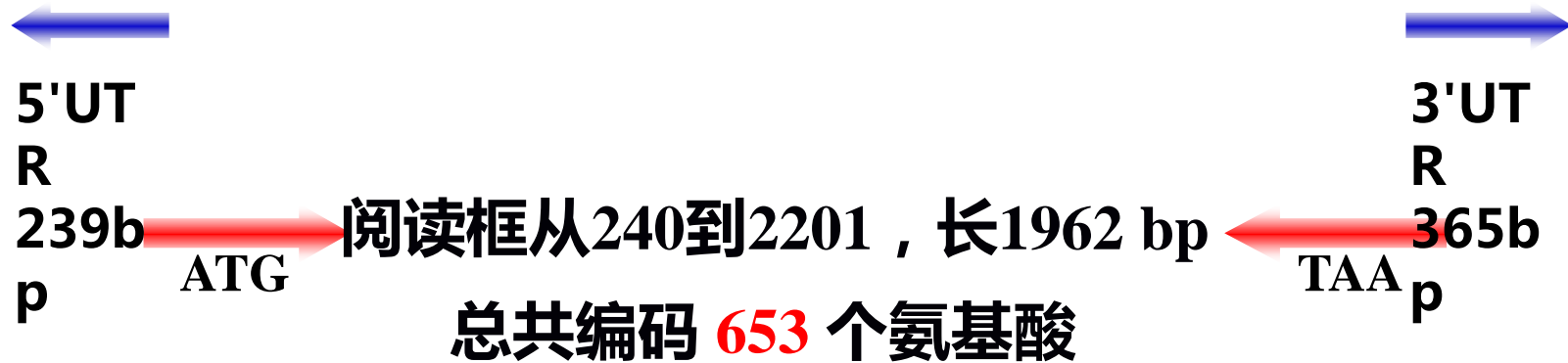


Hsp70在其中扮演什么样的角色呢？



B型烟粉虱Hsp70基因的克隆

B型烟粉虱Hsp70基因 cDNA全长：2565 bp



- 已经在Genebank登录, 序列号为: **EU934240.1**;
分子量大小: 71.0214 KDa; 等电点: 5.55



B型烟粉虱Hsp70氨基酸序列的特点

- ❖ B型烟粉虱的氨基酸均为小或极小氨基酸，占到100%；
- ❖ 脂肪族氨基酸占到全部氨基酸的28.8%；
- ❖ 无芳香族氨基酸；
- ❖ 非极性氨基酸占到全部氨基酸的81.9%。



B型烟粉虱Hsp70氨基酸序列的特点

部分密码子的高频编码序列

A	GCC	51.43%
D	GAC	51.43%
V	GTC	51.43%
N	AAC	40%
K	AAA	62.86%
I	ATC	51.43%



B型烟粉虱Hsp70氨基酸序列的特点

高频率的酶切位点

切割位点	频率
AciI	7
BlsI	6
BmsI	3
SetI	6
TauI	5

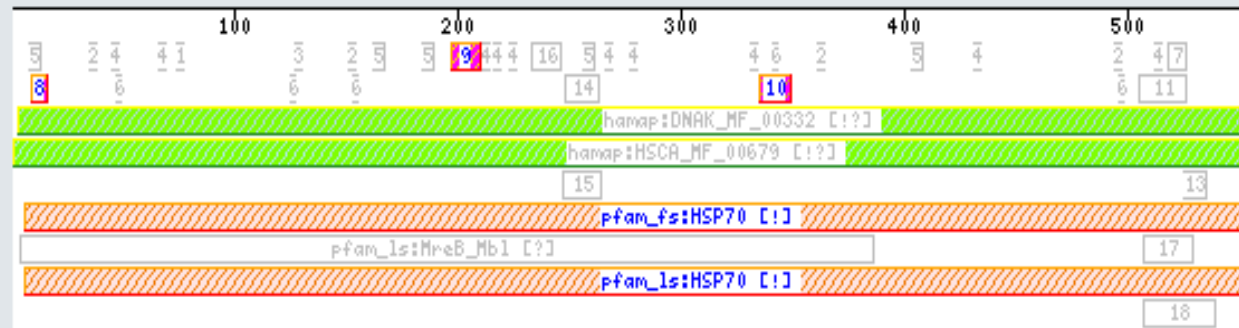


B型烟粉虱Hsp70氨基酸序列的特点

ExPASy → MyHits - protein domains database and tools

Original output

[perox](#), [hamap](#), [pat](#), [freq_pat](#), [prf](#), [pre](#), [pfam_fs](#), [pfam_ls](#).



Matches map

(features from query are above the ruler, matches of the motif scan are below the ruler)



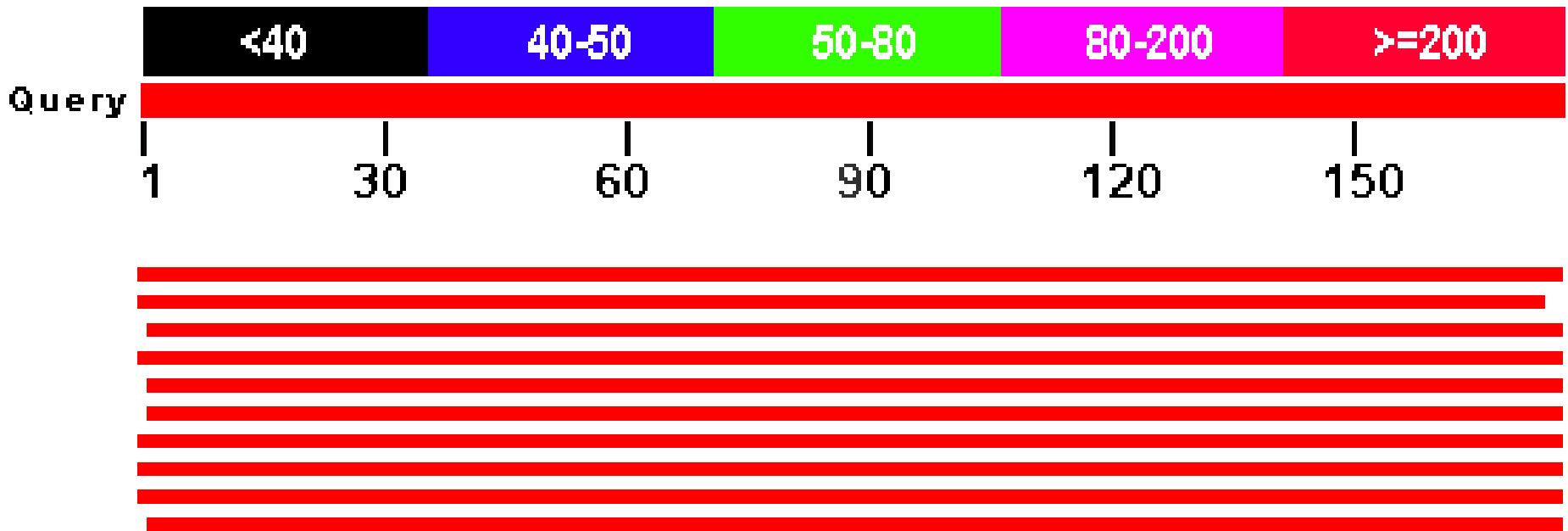
Legends: 1, freq_pat:AMIDATION [?]; 2, freq_pat:ASN_GLYCOSYLATION [?]; 3, freq_pat:CAMP_PHOSPHO_SITE [?]; 4, freq_pat:CK2_PHOSPHO_SITE [?]; 5, freq_pat:MYRISTYL [?]; 6, freq_pat:PKC_PHOSPHO_SITE [?]; 7, freq_pat:TYR_PHOSPHO_SITE [?]; 8, pat:HSP70_1 [!]; 9, pat:HSP70_2 [!]; 10, pat:HSP70 [!]; 11, prf:EF_HAND_2 [?]; 12, prf:GLY_RICH [!]; 13, prf:NEBULIN [?]; 14, prf:NLS_BP [?]; 15, pre:NLS_BP [?]; 16, pfam_fs:EspF [?]; 17, pfam_fs:FMBR [?]; 18, pfam_ls:FMBR [?].

包含Hsp70家族3个保守的标签序列：

9-16:
IDLGTTYS
197-210:
IFDLGGGTF
DVSIL
335-349:
VVLVGGST
RIPKIQS

B型烟粉虱Hsp70氨基酸序列的分析

利用**B型烟粉虱Hsp70氨基酸**序列进行BLAST比对，物种设置为昆虫。结果发现，不同昆虫的Hsp70相似程度高。其中数据库仅有同翅目昆虫两种，其余大多为鳞翅目昆虫，也有双翅目昆虫。



B型烟粉虱Hsp70氨基酸序列的分析

- ❖ 将相似度高于90%的不同昆虫的Hsp70序列进行对比，结果发现：不同个体（种群）的B型烟粉虱的Hsp70的序列第8-66位与141-177位两段较长的序列为保守序列。温室白粉虱与B型烟粉虱的保守区域基本一致，只是第47为不一致。
- ❖ 其中有三段区域，B型烟粉虱高度一致，而其它的昆虫则不一致。分别为第23-27位；47-49位；63-66位。



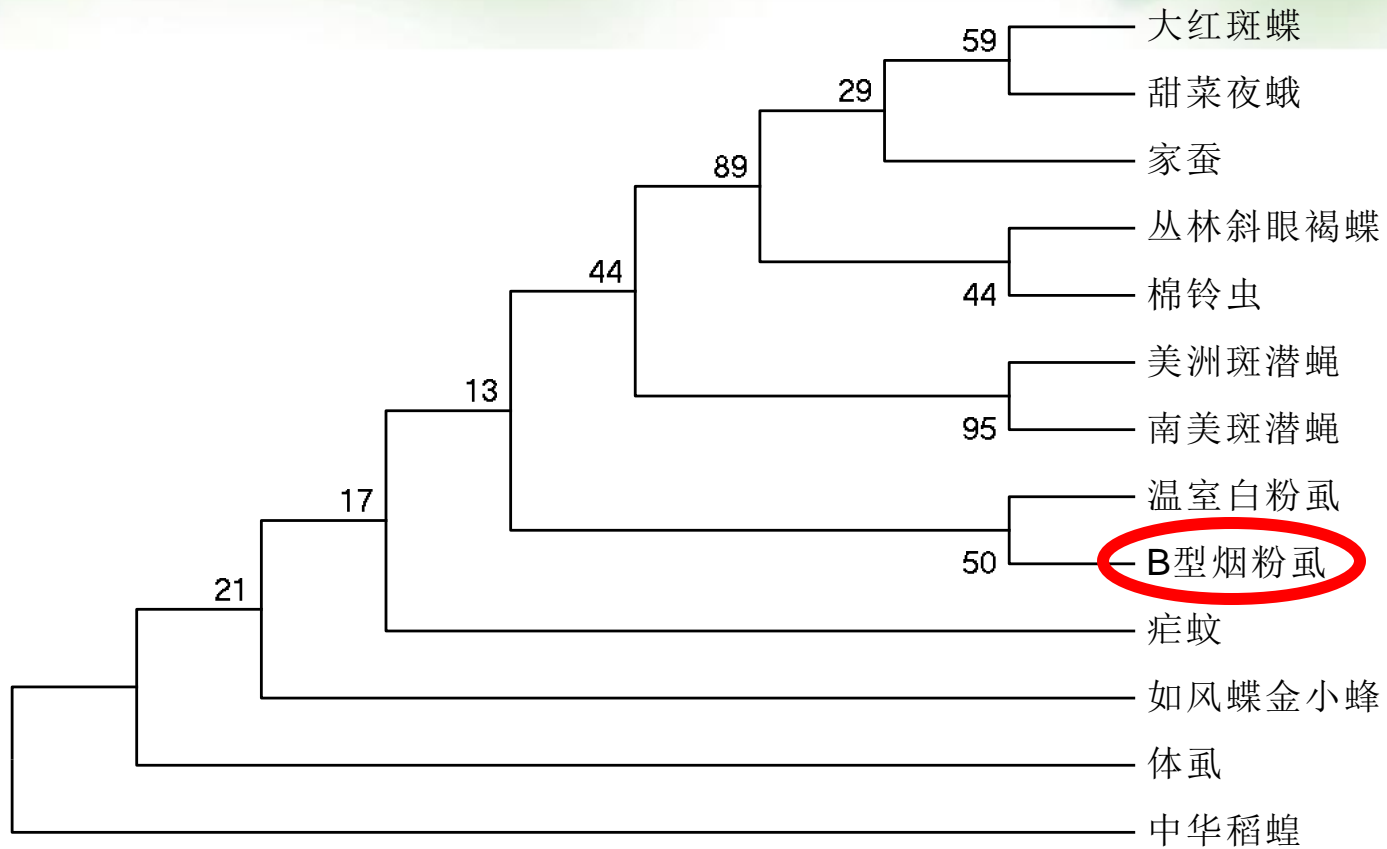
B型烟粉虱Hsp70氨基酸序列的分析

B型烟粉虱与其他物种的 Hsp70氨基酸序列比较

物种	一致性
人	81.72%
果蝇	85.23%
秀丽隐杆线虫	72.16%
玉米	75%
大鼠	77.27%



B型烟粉虱Hsp70氨基酸序列的分析



B型烟粉虱Hsp70与其他昆虫Hsp70的进化树分析

B型烟粉虱*Hsp70*的表达

表 1 高温暴露后 B 型烟粉虱 *hsp70* 表达的定量检测

温度(℃)	循环阈值(C _t)	起始拷贝数 (拷贝数/μL)
Temperature	Threshold cycles	Initial copies (copies/μL)
37	23.12	$8.78 \times 10^5 \pm 6.41 \times 10^4$ a
39	21.48	$2.46 \times 10^6 \pm 1.38 \times 10^5$ b
41	18.08	$1.99 \times 10^7 \pm 1.45 \times 10^5$ c
43	28.27	$3.60 \times 10^4 \pm 2.00 \times 10^3$ d
45	29.48	$1.76 \times 10^4 \pm 1.53 \times 10^3$ d

注：表中起始拷贝数数据为平均值 ± 标准误；同列数据后标有不同字母表示差异显著($P \leq 0.05$, S-N-K 检验)；表 2 同。

结果表明：随着胁迫温度的升高，B型烟粉虱*hsp70*的表达量也逐渐升高，在41℃时达到了最高峰，此后随着温度的升高，*hsp70*的表达量迅速下降。

B型烟粉虱*Hsp70*的诱导表达

表 2 气温变化对 B 型烟粉虱 *hsp70* 表达的影响

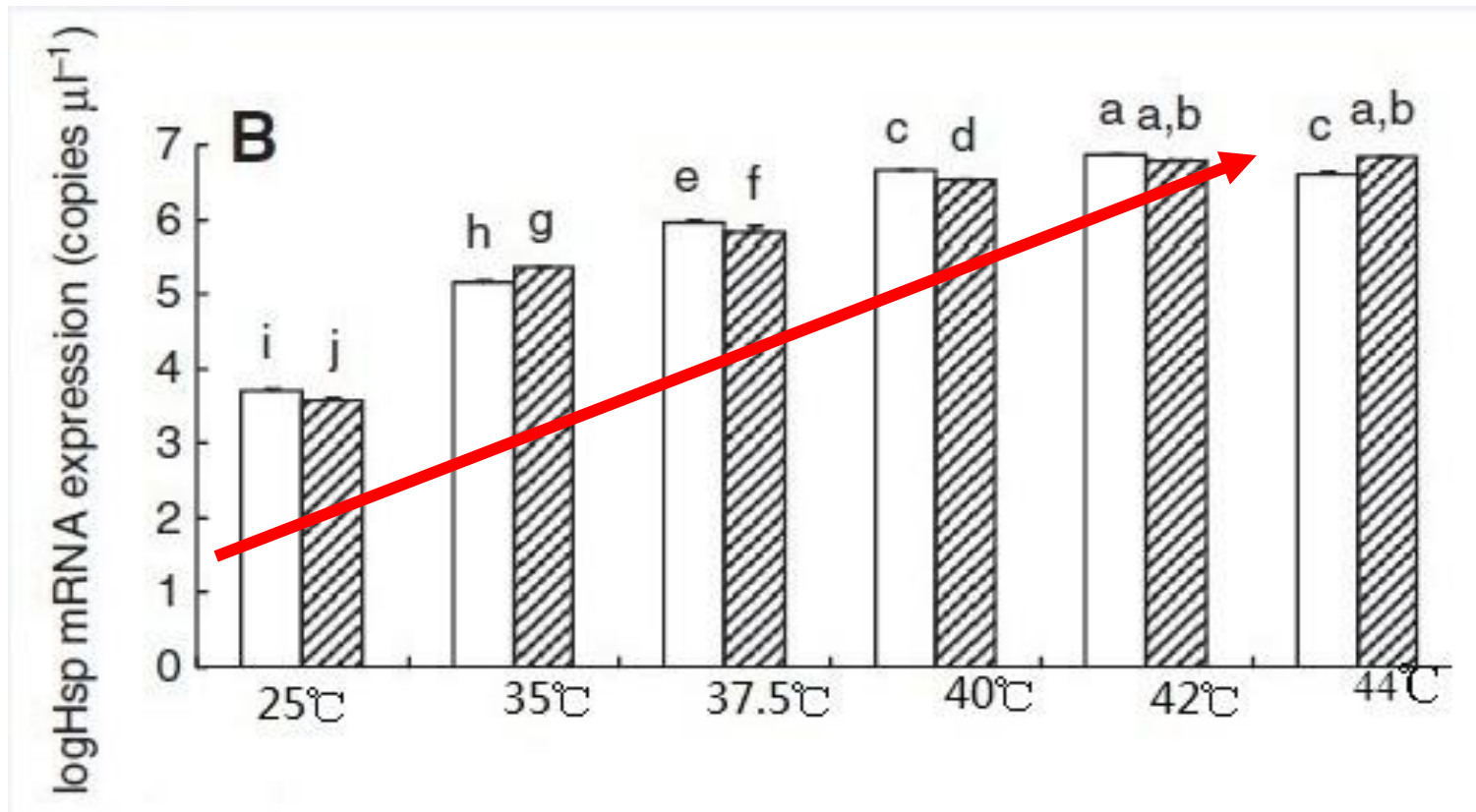
时间(h)	温度(℃)	循环阈值(Ct)	起始拷贝数 (拷贝数/ μL)
Time of day	Temperature	Threshold cycles	Initial copies (copies/ μL)
10:00	34.0	25.52	$1.16 \times 10^5 \pm 1.48 \times 10^4$ a
12:00	41.0	19.94	$6.29 \times 10^6 \pm 1.80 \times 10^5$ b
14:00	41.5	18.00	$6.47 \times 10^6 \pm 1.91 \times 10^5$ b
19:00	33.0	24.20	$2.32 \times 10^5 \pm 7.69 \times 10^3$ a

结果表明: B型烟粉虱体内的*hsp70*表达**随着气温的变化而变化**。随着气温的升高, B型烟粉虱成虫体内*hsp70*表达显著增加, 中午12:00与下午14:00时其表达量与早晚存在显著性差异。

RNAi

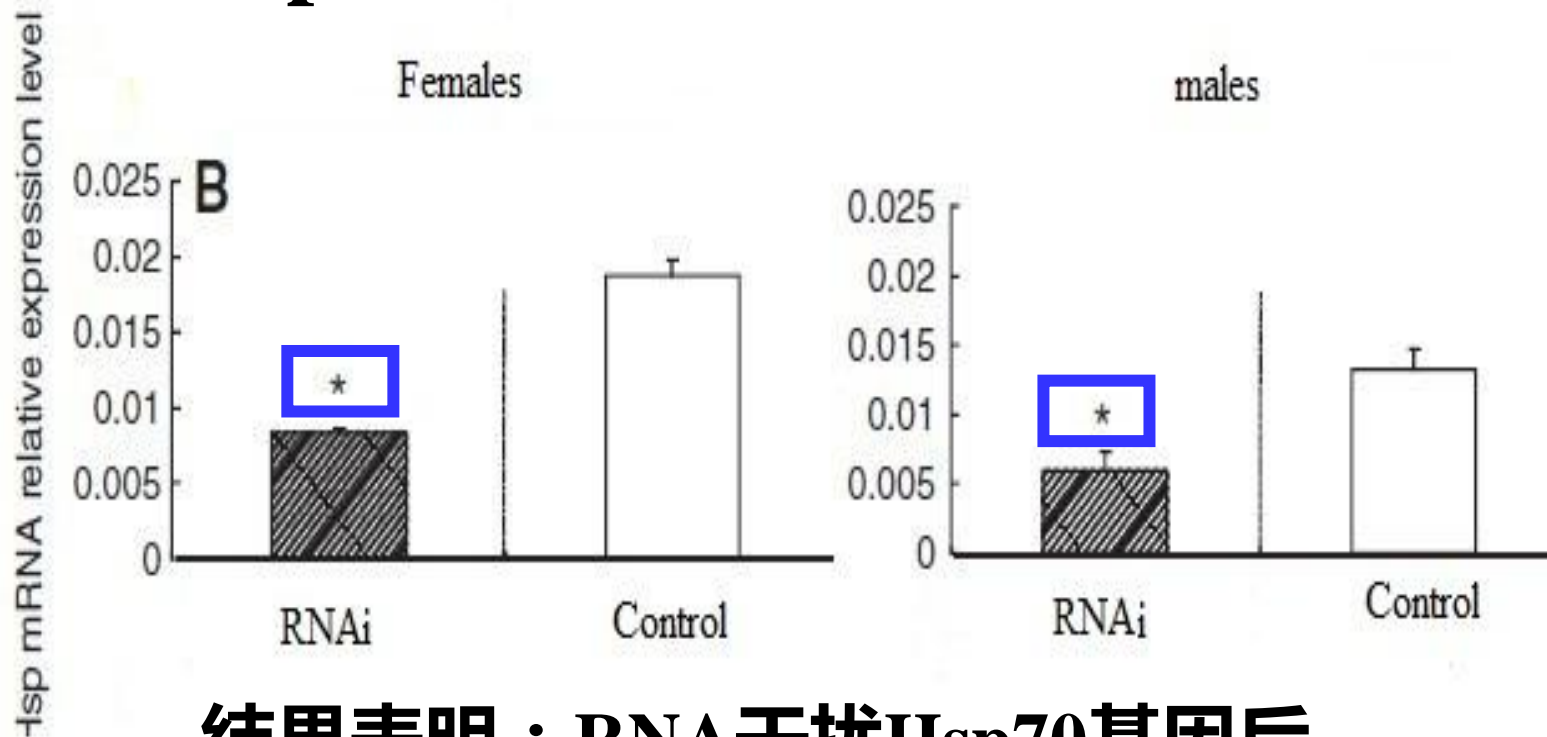
利用RNAi技术干扰B型烟粉虱*Hsp70*后，在热激条件下，B型烟粉虱雌雄成虫*Hsp70* mRNA的表达模式

B型烟粉虱雌雄虫在不同温度处理1h后 Hsp70 mRNA表达量的变化



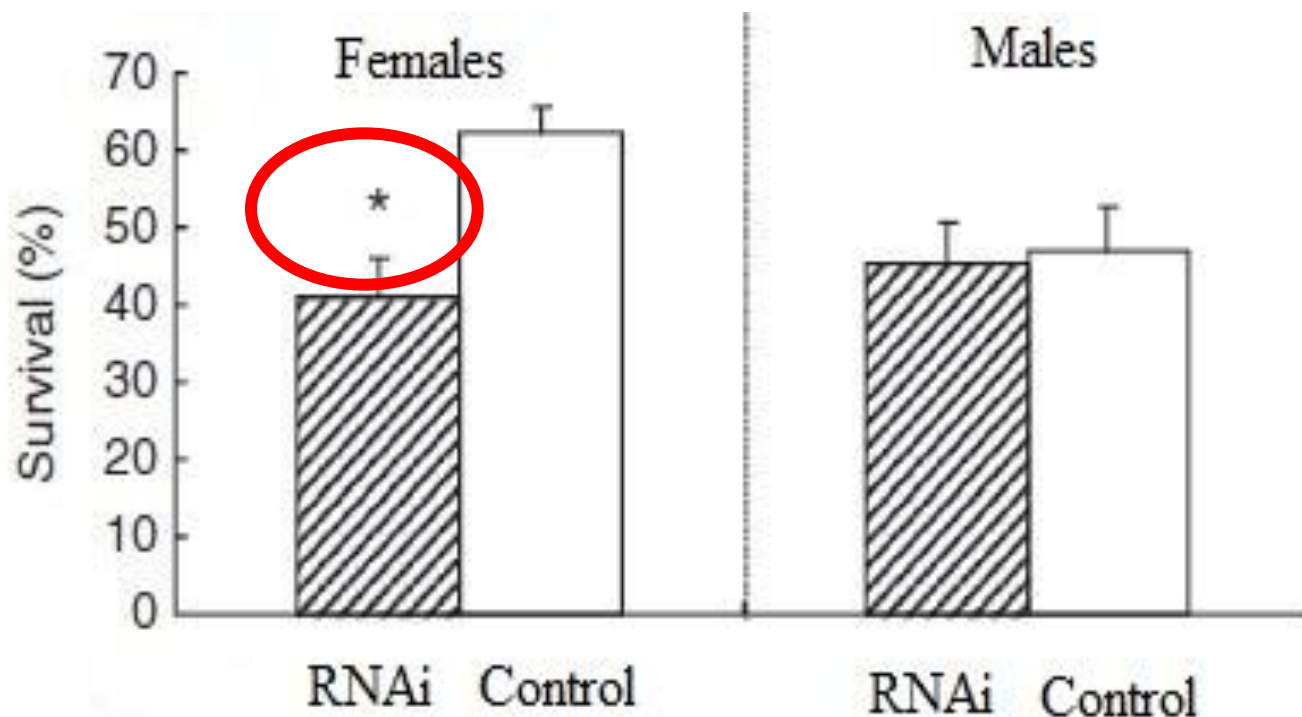
结果表明：在37.5°C到42°C，雌虫体内Hsp70的表达水平高于雄虫，然而在极端温度44°C时，雄虫体内Hsp70的表达水平反而高于雌虫

RNA干扰Hsp70基因后，B型烟粉虱雌雄虫在44℃处理1h后Hsp70 mRNA表达量的变化



结果表明：RNA干扰Hsp70基因后，处理组Hsp70 mRNA表达量显著低于对照组。

RNA干扰Hsp70基因后，B型烟粉虱雌雄虫在44℃处理1h后的耐热性



结果表明：饲喂Hsp70的双链RNA后，雌虫的存活率较对照组显著下降，而雄虫的存活率不变。

结 论

- ❖ **Hsp70表达量的变化在B型烟粉虱适应温度变化中起着重要的作用**
- ❖ **热激条件下，Hsp70对B型烟粉虱雌虫的作用比雄虫更明显**



下一步计划：

阐述B型烟粉虱对温度耐受能力的遗传特征及其对温度适应的微进化



谢谢大家！

